

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 730 493**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **95 01513**

⑬ Int Cl⁸ : C 07 K 14/16, 1/00, 1/14, C 12 N 15/48, 15/63, 7/00,
G 01 N 33/569, A 61 K 39/21, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 09.02.95.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 14.08.96 Bulletin 96/33.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑳ Inventeur(s) : MONTAGNIER LUC, GUETARD
DENISE, COHEN JACQUES, CHAMARET
SOLANGE, PHILBERT FREDERIQUE et TABARY
THIERRY.

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : ERNEST GUTMANN YVES
PLASSERAUD SA.

㉔ POLYPEPTIDES DE GLYCOPROTEINE TRANSMEMBRANAIRE D'ENVELOPPE DU RETROVIRUS HUMAIN DU
TYPE HIV-1 ET POLYPEPTIDES PRESENTANT AVEC EUX UNE PARENTE IMMUNOLOGIQUE.

㉕ Peptide ou polypeptide dérivé du virus HIV-1 MAD dé-
posé le 9 Février 1995 à la CNCM, sous la référence I-
1533, ou polypeptide ou peptide dont la séquence se dis-
tingue de celle du précédent par substitution, délétion ou
addition d'acides aminés, ce polypeptide ou peptide distinct
conservant néanmoins les caractéristiques antigéniques du
précédent.

FR 2 730 493 - A1



**Polypeptides de glycoprotéine transmembranaire d'enveloppe
du rétrovirus humain du type HIV-1 et polypeptides présentant avec
eux une parenté immunologique**

5 La présente invention est relative aux virus HIV, notamment à
un polypeptide et un peptide permettant une détection d'anticorps anti-HIV
que les peptides de l'art antérieur ne permettaient pas toujours de
détecter. L'invention est basée sur la découverte d'une nouvelle souche
10 HIV-1: HIV-1 MAD . L'antisérum dirigé contre elle ne présente aucun
réactivité avec les peptides ou polypeptides du consensus HIV tel qu'il est
utilisé de nos jours. Le terme «consensus HIV » se réfère aux régions
conservées entre isolats et dont la mise en évidence est essentielle à la
conception de vaccins ou de réactifs diagnostiques, et dont les mutations
confèrent la résistance aux médicaments antiviraux.

15 Des analyses phylogéniques de souches HIV-1 permettent de
distinguer au moins huit sous-types, le groupe O étant le plus divergent du
consensus HIV-1 (AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10:877-79).

 Une contrainte générale dans la mise au point de tests
sérologiques HIV, est d'éviter les réactions faussement positives, tout en
20 conservant la sensibilité que permettent les tests antérieurs en détection
de séropositivité.

 Les tests basés sur l'emploi de peptide(s) consensus,
essentiellement dérivés du gène « env », ont été considérés comme une
solution presque idéale jusqu'à ce que la découverte du variant HIV-1-O
25 fasse entrevoir la possibilité de résultats faussement négatifs (Genomic
cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african
human immuno-deficiency virus isolate. J. Virol. 1994; 68: 1586-96 ; a new
subtype of human immuno-deficiency virus type 1 (MPV-5180) from
Cameroon. J. Virol. 1994; 68:1581-85).

30 La non-réactivité de certains tests à antigène peptidique
« env », chez des patients présentant quand même certains syndromes

cliniques caractéristiques du SIDA ou des syndromes lymphadénopathiques qui parfois les précèdent, est, à ce jour, parfois imputée à une infection du groupe HIV-1-O (HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients, Lancet 1994; 343:1393-94 ; New HIV-1 subtype in the Switzerland. Lancet 1994; 344:270-71).

Contrairement au groupe HIV-1-O qui est considérablement différent des autres types HIV-1, la souche HIV-1 MAD de la présente invention présente une certaine homologie de séquence avec le groupe. Malgré cela, elle échappe à la détection par peptides consensus des glycoprotéines gp41 et gp120 issus de ce virus.

Ainsi, la présente invention a pour but de mettre à disposition des laboratoires de diagnostic des moyens, notamment des peptides et polypeptides spécifiques permettant une détection d'anticorps anti-HIV, qui étaient jusqu'à ce jour susceptibles d'être indétectables. Elle concerne enfin des mélanges de peptides issus de HIV-1 MAD et de peptides correspondants d'autres HIVs, de façon à éviter les résultats « faux négatifs » potentiels.

L'invention découle des observations faites sur une femme asymptomatique d'origine zaïroise et séropositive, au cours de plusieurs tests de dépistages de l'infection HIV, confirmés par des techniques de « Western blot ». Cette patiente n'a cependant pas montré de réactivité aux tests basés sur la reconnaissance de peptides « env » spécifiques du HIV-1 de groupe O. D'autres analyses à base de peptides spécifiques ont établi que son sérum ne réagissait que modérément avec des peptides spécifiques du groupe HIV-1, ou des peptides du groupe HIV-1-O, mais réagissait avec un seul peptide de la boucle V3 d'un type africain.

On a réalisé le séquençage de la glycoprotéine gp41 et de la boucle V3 de gp120 V3 à partir d'ADN lymphocytaire et de cultures virales, indiquant que cette souche HIV MAD appartient d'une part au groupe HIV-1-M, et qu'elle diffère de façon importante du groupe O, sans être non plus totalement identique à aucun des autres types HIV-1 déjà

caractérisés. De plus, on a constaté que cette souche ne présente pas, du moins dans les conditions expérimentales mises en oeuvre et qui sont rapportées ci-après, la réactivité vis-à-vis des peptides consensus de la région immuno-dominante de gp41, malgré un nombre réduit de substitutions d'acides aminés dans sa séquence peptidique, en comparaison aux régions immunodominantes d'autres souches HIV-1.

Cette observation démontre que des variants HIV distincts du groupe O, bien que moins éloignés du consensus HIV-1, peuvent tout de même échapper à une détection sérologique, dans le cas où celle-ci se basait uniquement sur les peptides consensus exprimés par le gène *env*.

Ainsi, la présente invention concerne un polypeptide ou un peptide issus du virus HIV-1 MAD déposé le 9 Février 1995 à la CNCM, sous la référence I-1533, celui-ci comportant dans son génome des séquences nucléotidiques codant les séquences peptidiques ci-après présentées.

En variante, l'invention concerne un polypeptide ou un peptide dont la séquence se distingue de celle des précédents par substitution, délétion ou addition d'acides aminés, ce polypeptide et ce peptide dérivés conservant néanmoins les caractéristiques antigéniques des précédents.

Une glycoprotéine exprimée par le gène « *env* » de la souche HIV-1 MAD est la glycoprotéine gp41 dont une partie de la séquence peptidique et de la séquence nucléotidique correspondante sont représentées à la figure 1B.

Ainsi, un polypeptide ou un peptide selon l'invention est un polypeptide ou un peptide contenant la séquence peptidique représentée à la figure 1B ou une partie peptidique contenant :

a) soit la séquence d'acides aminés

RVLAVERYLQDQQLGIWGC SGKHI

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par

d'autres acides aminés de sorte que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

5 c) soit une séquence d'acides aminés selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

Préférentiellement, un polypeptide ou peptide selon l'invention est un polypeptide ou un peptide caractérisé en ce qu'il contient :

10 a) soit la séquence RVLAVERYLQDQQLLGIWGC SGKHICTTT

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

15 c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide a).

20 De façon particulièrement avantageuse, le polypeptide ou le peptide est caractérisé en ce qu'il contient :

a) soit la séquence
RLAVERYLQDQQLLGIWGC SGKHICTTTVPWNS,

25 b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

30 c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés

sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

Une autre glycoprotéine exprimée par le gène « *env* » de la souche HIV-1 MAD est la glycoprotéine gp120 dont une partie de la séquence peptidique et de la séquence nucléotidique correspondante sont représentées à la figure 1A.

Ainsi, l'invention vise également un polypeptide ou un peptide contenant la séquence représentée sur la figure 1A ou une partie de ce polypeptide contenant:

a) soit la séquence d'acides aminés QRTGIGPGQALYTTHR,
b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés de sorte que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

De manière préférée, ce polypeptide ou peptide est caractérisé en ce qu'il contient :

a) soit la séquence

CTRPYKNTRQRTGIGPGQALYTTHRIIGDIRQAHC

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés distincte des séquences selon a) et b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés de sorte que le polypeptide ou le peptide

conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

L'invention vise également des acides nucléiques codant des polypeptides ou des peptides tels qu'ils sont définis ci-dessus.

5 Un acide nucléique entrant dans le cadre de l'invention correspond à la séquence nucléotidique codant une partie de la séquence peptidique de la gp41. Ces deux séquences sont représentées sur la figure 1B.

10 Un autre acide nucléique entrant également dans le cadre de la présente invention correspond à la séquence nucléotidique codant une partie de la séquence peptidique de gp120. Ces deux séquences sont représentées sur la figure 1A.

L'invention a également trait aux vecteurs contenant un acide nucléique tel qu'il est défini ci-dessus.

15 Ainsi, des vecteurs selon l'invention sont les plasmides contenant les acides nucléiques ci-dessus définis, tels que déposés le 9 Février 1995 à la CNCM sous la référence I-1534 pour gp 120 et _____ pour gp 41.

20 L'invention vise également des cellules susceptibles de contenir un acide nucléique, cet acide nucléique répondant à une des séquences nucléotidiques telle qu'elles sont définies ci-dessus.

Alternativement, ces cellules sont transfectées par un vecteur répondant aux caractéristiques d'un vecteur précédemment décrit.

25 La présente invention concerne également un virus tel que celui déposé le 9 Février 1995 à la CNCM sous la référence I-1533.

30 Un virus entrant également dans le cadre de l'invention est un virus de même sous-type que le précédent, caractérisé en ce que des peptides consensus de ce virus sont reconnus par des anticorps reconnaissant spécifiquement un polypeptide ou un peptide précédemment défini.

L'ARN génomique du virus précédemment défini entre également dans le cadre de l'invention.

Entre également dans le cadre de l'invention, un nécessaire ou trousse de détection d'anticorps dans le sérum ou tout autre échantillon biologique de patient susceptible d'être infecté par un rétrovirus humain du type HIV, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un polypeptide ou un peptide ayant pour séquence une des séquences décrites ci-dessus;

- des moyens permettant la réaction de formation du complexe immunologique entre le(s) polypeptide(s) ou le(s) peptide(s) et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique à tester, par exemple si besoin un ou plusieurs tampons en incubation,

- un échantillon témoin négatif,

- des moyens de révélation du complexe antigène/anticorps formé.

Egalement selon l'invention, cette trousse contient, en outre, au moins un polypeptide ou un peptide consensus dérivé d'une autre souche HIV ou d'un polypeptide ou d'un peptide comprenant,

- soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de ce polypeptide ou peptide dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus,

- soit une séquence d'acides aminés dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus.

Préférentiellement, une trousse selon l'invention contiendra, en outre, au moins un polypeptide ou un peptide dérivé d'une autre souche HIV, de préférence la souche HIV-LAI ou la souche HIV-MN.

L'invention concerne également une composition polypeptidique pour le diagnostic in vitro d'une infection due au rétrovirus selon l'invention, ou à un de ses variants ce diagnostic s'effectuant dans un échantillon biologique susceptible de contenir les anticorps formés après ladite infection. Cette composition est caractérisée en ce qu'elle
5 comprend au moins un polypeptide ou un peptide selon l'invention.

L'échantillon biologique peut être constitué notamment de sang, de plasma, de sérum ou de tout autre extrait biologique. Les compositions ci-dessus sont utilisables pour la détection d'anticorps dans
10 un des échantillons biologiques susdits.

L'invention vise donc également une méthode de diagnostic in vitro d'une infection due spécifiquement à un rétrovirus du type HIV, caractérisée par les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de
15 contenir des anticorps produits à la suite d'une infection par un rétrovirus du type HIV-1, avec un polypeptide ou un peptide répondant aux définitions ci-dessus, ou avec une composition polypeptidique ou peptidique décrite ci-dessus, dans des conditions appropriées permettant la formation d'un complexe immunologique du type antigène/anticorps,

20 - détection de l'éventuelle présence du complexe.

L'invention concerne par ailleurs une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide et un peptide en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable pour la constitution de vaccins.

25 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation des glycoprotéines gp41 et gp120 de la souche rétroviral selon l'invention, le procédé étant caractérisé par les étapes suivantes :

- lyse des cellules infectées par un rétrovirus HIV-1 selon l'invention et séparation du surnageant et des cellules infectées ou lyse
30 des culots viraux préparés par centrifugation,

- dépôt de l'extrait cellulaire et/ou de l'extrait viral sur immuno-adsorbant contenant des anticorps purifiés, obtenus à partir d'un sérum de sujet infecté par le rétrovirus selon l'invention, et fixés avantageusement sur un support adapté, ledit sérum de sujet infecté ayant la capacité de réagir fortement avec des protéines d'enveloppe du virus selon l'invention,

- incubation en présence d'un tampon et pendant un temps suffisamment long pour obtenir la formation d'un complexe immunologique antigène/anticorps,

- lavage de l'immuno-adsorbant avec un tampon pour éliminer les molécules non retenues sur le support,

- récupération des protéines antigéniques recherchées.

Selon un premier mode de réalisation de ce procédé de préparation, la séparation et la récupération des glycoprotéines gp41 et gp120 de HIV-1 MAD sont faites par électrophorèse et par électroréduction des protéines.

Selon un autre mode de réalisation de ce procédé de préparation, la récupération des protéines est obtenue par :

- élution des protéines fixées sur l'immuno-adsorbant ci-dessus,

- purification des produits ainsi élués sur une colonne de chromatographie contenant, fixés sur le support de séparation, des anticorps reconnaissant la glycoprotéine gp41 ou la gp120 de HIV-1 MAD.

Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé de production d'un polypeptide ou d'un peptide selon l'invention, ce polypeptide ou peptide étant obtenu

- soit par l'expression d'un acide nucléique de l'invention,

- soit par synthèse chimique, par addition d'acides aminés jusqu'à l'obtention de ce polypeptide ou de ce peptide.

Les principes et les procédés classiques du génie génétique peuvent être ici utilisés (« Molecular cloning », Sambrook, Fritsch, Maniatis, CSH 1989)

5 Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé de production d'un acide nucléique précédemment défini, pouvant être produit soit par isolement à partir du virus de l'invention, soit par synthèse chimique, soit en utilisant des techniques d'amplification in vitro des acides nucléiques à partir d'amorces spécifiques.

10 Ainsi, l'invention a également trait à des amorces oligonucléotidiques utilisées lors de l'amplification d'acides nucléiques codant des oligopeptides de glycoprotéine d'enveloppe, par exemple la glycoprotéine gp120 V3 de la souche HIV-1 MAD de la présente invention, et de toute séquence gp 120 V3 d'un virus HIV-1 du groupe M.

15 Ces amorces oligonucléotidiques sont caractérisées en ce qu'elles ont une séquence consistant en au moins huit nucléotides consécutifs des séquences nucléotidiques suivantes :

AATGGCAGTCTAGCAGAAGAA, ou

TCCTCAGGAGGGGACCCAGAA.

20 Selon l'invention, ces amorces peuvent être utilisées lors d'un processus d'amplification génique, par exemple par PCR ou une technique équivalente, d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide de l'invention.

Egalement, l'invention concerne une trousse permettant l'amplification par PCR ou une technique équivalente ci-dessus décrite.

25 Entre également dans le cadre de la présente invention, un procédé de détection de la présence dans un échantillon biologique d'acide(s) nucléique(s) caractéristique(s) d'une rétrovirus de type HIV, y inclus d'un rétrovirus selon l'invention. Ce procédé comprend une mise en contact d'un ADNc formé à partir d'ARN(s) contenu(s) dans cet échantillon
30 biologique, dans des conditions permettant l'hybridation de cet ADNc avec

le génome rétroviral, et la réalisation d'une amplification génique sur cet échantillon viral.

L'invention concerne également un lysat viral tel qu'il est obtenu par lyse des cellules infectées par un virus selon l'invention

5 Un extrait protéique d'une souche HIV-MAD contenant notamment un polypeptide ou un peptide tel que précédemment défini entre également dans le cadre de l'invention.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans le (les) exemples et les figures.

Légende des figures

- Figure 1 : superposition de séquences nucléotidiques HIV 1-MAD et des séquences peptidiques codées correspondantes.

15 - Figure 1A : fragment des séquences nucléotidiques et peptidiques de la boucle V3 de la glycoprotéine gp120,

- Figure 1B : fragment des séquences nucléotidiques et peptidiques, comprenant la région immuno-dominante de la glycoprotéine gp41;

20 - Figure 2 : comparaison des séquences d'acides aminés de la boucle V3 de la glycoprotéine gp120 (figure 2A) et de la région immuno-dominante de la glycoprotéine gp41 (figure 2B), sur différents types de souches HIV-1.

MAD: souche HIV-1 MAD,

LAI : souche HIV BRUCG

25 OYI : souche HIV OYI

ELI : souche HIV ELICG

MAL : souche HIV MAL

455 : souche HIV 455A

CPZ : souche HIV CG

30 ANT : souche HIV ANT70C

MVP : souche HIV MVP5518

VAU : souche HIV VAU

La séquence CPZ est issue d'une glycoprotéine d'une souche du type SIV ; ANT, MVP et VAU sont des séquences issues de glycoprotéines de souches du groupe HIV-1-O.

5 Les changements d'acides aminés par rapport au consensus LAI sont représentés en gras lorsque ceux-ci sont retrouvés dans la séquence de la souche MAD.

Localisation de certains peptides : région immunodominante de gp41 (LAI [==]), ANT [≈≈]), O VMP 5180 [—].

10

Exemple :

Des séquences d'ADN de lymphocytes du sang périphérique et de cultures virales d'ADN ont été obtenues par amplification génique d'ADN. Dans le procédé d'amplification employé, les inventeurs ont utilisé
15 les amorces nucléotidiques suivantes :

CGCGAGCTGCAGTGTTCCTTGGGTTCTTG et
CGCGAGCTGCAGGAGTTTCCAGAGGAACCCC, ainsi que
CGCGAGCTGCAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTC et
CGCGAGCTGCAGTTCTTGTTCAATTCTTTCTTGCTG pour la région de
20 la glycoprotéine gp41, ainsi que les amorces
CGCGAGCTGCAGAATGGCAGTCTAGCAGAAGAA et
CGCGAGCTGCAGTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA pour la région V3 de
la glycoprotéine gp120.

Toutes les amorces utilisées avaient en commun un
25 extrémité 5' contenant un site PST1 permettant le clonage ultérieur dans un plasmide Bluescript®. Les produits d'amplification ont été clonés soit selon les techniques classiques utilisant les amorces universelles T3 et T7, soit directement séquencés par l'utilisation des amorces de la précédente amplification. Les séquences ont ensuite été déterminées par le dispositif
30 automatique de séquençage Applied Biosystems 373A (ESGS Montigny le Bretonneux, France).

Dans une séquence partielle de la glycoprotéine gp41 (souche HIV-1 MAD) codant 124 acides aminés, 11 d'entre eux se sont révélés différents de ceux de la séquence consensus LAI. En comparant ces 11 acides aminés dans les séquences peptidiques des diverses autres souches décrites ci-dessus, on retrouve des acides aminés communs :

séquence OYI : 5 acides aminés
séquence ELI : 6 acides aminés
séquence MAL : 7 acides aminés
séquence 455 : 7 acides aminés
séquence CPZ : 4 acides aminés
séquence ANT : 3 acides aminés
séquence MPV : 2 acides aminés
séquence VAU : 2 acides aminés.

Bien que moins divergente de la séquence consensus LAI que des souches de groupe O, la séquence peptidique partielle de gp41 MAD n'est cependant identique à aucune de celles des autres souches HIV-1 connues (Figure 2B).

La réactivité sérologique semble être abolie par seulement quelques changements d'acides aminés de la région immunodominante de la glycoprotéine gp41. En l'espèce, seules 4 différences ont été observées dans cette région (3 dans chaque peptide testé). Plus particulièrement, le simple échange d'une Leucine (23ème acide aminé de la séquence LAI de la figure 2) par une Histidine, au niveau de la petite boucle SGKLI située entre deux cystéines, apparaît critique. Un épitope spécifique de la région immunodominante de gp 41 de HIV-MAD semble donc être déterminé par un seul acide aminé.

Concernant la séquence de la glycoprotéine gp120 incluant la boucle V3, elle est constituée de 96 acides aminés dont 40 se sont révélés différents de la séquence consensus LAI.

Certains acides aminés, sur un total de 40, de la séquence de la gp120 des différentes souches de la figure 1A sont retrouvés chez HIV, MAD :

	séquence OYI : 8 acides aminés
5	séquence ELI : 21 acides aminés
	séquence MAL : 18 acides aminés
	séquence 455 : 10 acides aminés
	séquence CPZ : 7 acides aminés
	séquence ANT : 4 acides aminés
10	séquence MPV : 8 acides aminés
	séquence VAU : 9 acides aminés

La souche HIV-1 MAD s'est révélée considérablement divergente dans sa séquence par rapport au consensus LAI. Bien que plus
15 proche des souches ELI et MAL, la souche MAD n'a révélé aucune identité avec les souches de type HIV-1 connues (figure 2) ; la souche HIV-1 MAD présente un motif GPGQALYT commun avec une autre souche africain (HIV-1 MAL) au niveau de la boucle V3. Ce point commun de séquence est
20 très certainement responsable des réactivités sérologiques croisées observées.

REVENDICATIONS

1. Peptide ou polypeptide dérivé du virus HIV-1 MAD déposé le 9 Février 1995 à la CNCM, sous la référence I-1533, ou polypeptide ou peptide dont la séquence se distingue de celle du précédent par substitution, délétion ou addition d'acides aminés, ce polypeptide ou peptide distinct conservant néanmoins les caractéristiques antigéniques du précédent.

2. Polypeptide ou peptide contenant la séquence représentée à la figure 1B ou partie de ce polypeptide ou peptide contenant :

a) soit la séquence d'acides aminés

RVLAVERYLQDQQLLGIWGCSGKHI

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou peptide de a).

3. Polypeptide ou peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il contient :

a) soit la séquence RVLAVERYLQDQQLLGIWGCSGKHICTTT

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés distincte des séquences selon a) et b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide

conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

5 4. Polypeptide ou peptide selon la revendication 2 ou la 3, caractérisé en ce qu'il contient :

a) soit la séquence
RVLAVERYLQDQQLLGIWGC SGKHICTTTVPWNS

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou
10 le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés distincte des séquences selon a) et b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide
15 conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

5. Polypeptide ou peptide contenant la séquence représentée à la figure 1A ou partie de ce polypeptide ou de peptide
20 contenant

a) soit la séquence d'acides aminés QRTGIGPGQALYTTHR,

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou
25 le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

c) soit une séquence d'acides aminés distincte des séquences selon a) et b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide
30 conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

6. Polypeptide ou peptide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient :

a) soit la séquence

CTRPYKNTRQRTGIGPGQALYTTHRIIGDIRQAHC

5 b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a);

10 c) soit une séquence d'acides aminés distincte des séquences selon a) et b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés de sorte que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide de a).

15 7. Acide nucléique contenant une séquence codant pour un polypeptide ou un peptide selon les revendications 1 à 6.

8. Acide nucléique selon la revendication 7, dont la séquence nucléotidique est représentée à la figure 1A.

20 9. Acide nucléique selon la revendication 7, dont la séquence nucléotidique est représentée à la figure 1B.

10. Vecteur contenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

11. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce que c'est un plasmide.

25 12. Vecteur caractérisé en ce qu'il est le plasmide contenant l'acide nucléique de la revendication 8, tel que déposé le 9 février 1995 à la CNCM sous la référence I-1534.

13. Cellule contenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

5 14. Virus déposé le 9 Février 1995 à la CNCM sous la référence I-1533.

15. Virus selon la revendication 14 de même type ou sous type que le virus de la revendication 14 caractérisé en ce que des peptides consensus de ce virus sont reconnus par des anticorps reconnaissant spécifiquement un polypeptide ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10 16. L'ARN génomique du virus selon la revendication 14 ou 15

17. Trousse de détection in vitro d'anticorps contre HIV, contenant au moins un polypeptide ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

15 18. Trousse selon la revendication 17, contenant en outre au moins un polypeptide ou un peptide consensus dérivé d'une autre souche HIV comprenant:

20 soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de ce polypeptide ou de ce peptide dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus,

25 soit une séquence d'acides aminés dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus.

19. Trousse selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que l'autre souche HIV est une souche HIV-LAI.

20. Composition polypeptidique ou peptidique pour le diagnostic in vitro d'une infection due au virus selon la revendication 14 ou 15, ladite composition comprenant au moins un polypeptide ou un peptide selon les revendications 1 à 6.

5 21. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide et un peptide ou le peptide en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable pour la constitution de vaccins.

10 22. Méthode pour la detection in vitro d'anticorps anti HIV-1 par mise en contact d'un échantillon biologique avec un polypeptide ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

23. Procédé de production d'un polypeptide ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le polypeptide ou le peptide est obtenu

15 - soit par l'expression d'un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9

- soit par synthèse chimique, par addition d'acides aminés jusqu'à obtention du polypeptide ou du peptide complet.

20 24. Oligonucléotide ayant une séquence consistant en au moins huit nucléotides consécutifs des séquences nucléotidiques suivantes:

AATGGCAGTCTAGCAGAAGAA, ou
TCCTCAGGAGGGGACCCAGAA.

25 25. Oligonucléotide selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il peut être utilisé lors d'un processus d'amplification génique d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

26. Trousse d'amplification génique selon la revendication 25.

30 27. Procédé de détection de la présence, dans un échantillon biologique, d'acide nucléique caractéristique d'un rétrovirus de type HIV y

inclus d'un retrovirus selon la revendication 14 ou 15, comprenant la mise en contact d'un ADNc formé à partir d'ARN(s) contenu(s) dans cet échantillon biologique dans des conditions permettant l'hybridation de cet ADNc avec le génome rétroviral, et la réalisation d'une amplification génique sur cet échantillon viral.

28. Lysat viral tel qu'il est obtenu par lyse des cellules infectées par un virus selon la revendication 14 ou 15.

29. Extrait protéique de souche HIV-MAD contenant notamment un polypeptide ou un peptide antigénique selon l'une
10 queiconque des revendications 1 à 6.

1/2

```

-----
Sequence : MADV3          Position      1 a   388   Phase 1
-----
      1          16          31
ATC ATA ATT AGA TCT GAA AAT CTC ACA GAC AAT GCT AAA AAC ATA
I I I R S E N L T D N A K N I
46          61          76
ATA GTA CAG CTT AAT GAA TCT ATA GCA ATT AAT TGT ACA AGG CCC
I V Q L N E S I A I N C T R P
91          106          121
TAC AAA AAT ACA AGA CAA CGT ACA GGT ATA GGA CCA GGG CAA GCA
Y K N T R Q R T G I G P G Q A
136          151          166
CTC TAT ACA ACC CAT AGA ATA ATA GGA GAC ATA AGA CAA GCA CAT
L Y T T H R I I G Q I R Q A H
181          196          211
TGT AAT ATT AGT GAA GCG GAC TGG AAT AAA ACT GTA CAA CGG GTA
C N I S E A D W N K T V Q R V
226          241          256
GCT ATA AAA TTA AGA CAC CTT TTT AAT AAA ACA ACA ATA GCT TTT
A I K L R H L F N K T T I A F
271
AGA CCA TCC TCA GGA GGG
R P S S G G

```

```

-----
Sequence : MADGF41       Position      1 a   372   Phase 1
-----
      1          16          31
TTG CTT GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC ACG ATG GGC GCA GGG
F L G F L G A A G S T M G A A
46          61          76
TCA ATC ACG CTG ACG GTA CAG GCG AGA ACA TTA CTG TCT GGT ATA
S I T L T V Q A R T L L S G I
91          106          121
GTG CAG CAG CAA AAC AAT TTG CTG AGG GCT ATA GAG GCG CAA CAG
V Q Q Q N N L L R A I E A Q Q
136          151          166
CAT CTG TTG CAA CTC ACG GTC TGG GGC ATT AAA CAG CTC CAG GCA
H L L Q L T V W G I K Q L Q A
181          196          211
AGA GTC CTG GCT GTG GAG AGA TAC CTA CAG GAT CAA CAG CTC CTA
R V L A V E R Y L Q D Q Q L L
226          241          256
GGA ATT TGG GGT TGC TCT GGA AAG CAT ATT TGC ACC ACT ACT GTG
G I W G C S G K H I C T T I V
271          286          301
CCT TGG AAC TCT AGT TGG AGT AAT AAA TCT CTA GAG GAG ATT TGG
P W N S S W S N K S L E E I W
316          331          346
CAG AAC ATG ACC TGG ATG GAG TGG GAA AGA GAA ATT GAC AAT TAC
Q N M T W M E W E R E I D N Y
ACA GGA TTA ATA
T G L I

```

region boucle v3 de gp 120

----YK---QRTG-___-Q-LY-___THR-I-DI-_____
CTRPNNTRKSIRIQGPGRFVT___IGKI_GNM_RQAHQ
-----NR-S-___-----H-___TKQ-I-DI-_____
-A--YQ---QRTP-___-L-QSLY-___TR_SRSI-___G-_____
-----G-----RGIHF-___-QALY-___T-___-V-DI-___R-Y-_____
-S--Y-TRKNIRRYSI-S-QAFVY___T-___-I-DI-___-Q-_____
-H--G-___-GE___VQI-___-MTFYN-___-ENVV-DT-___-S-Y-_____
-E--QIDIQE___MRI-___MAWYSMG-___GTA-___SS-___-Y-_____
-IREGIAEVQDIYT-___-MRWRSM_TLKRSNNTS-V-Y-_____
-E--GNQTIQKIMA-___-MAWYSMALSNK-DT-___-A-Y-_____

region immunodominante de gp41

[-----]
[=====]
-V-----Q-----H---T---S---
RILAVERYLKDQQLLGIWGCGSKLICTTAVPWNASWS
-V-----T-----
-----H---N---S---
-V-----Q---R---M-----H---F---S---
-V-----Q-----T---S---
-L-----Q---I---L-----AV-Y-T---N---P
-L--L-TL-QN-----SL-----K--V-Y-S-K--RT-I
-LQ-L-TLIQN---R-NL-----K-----Y-S-K--RT-I
-L--L-TFIQN-----NL-----KNR--Y-S-K--KT-G
[_____]

FIGURE 2A

FIGURE 2B

FIGURE 2

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 513125
FR 9501513

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-90 13630 (INSERM) * le document en entier * ----	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 1, Janvier 1995 pages 263-271, LOOWAGIE, J. ET AL. 'Genetic diversity of the envelope glyco protein from Human Immunodeficiency Virus Type 1 isolates from african origin' * le document en entier * ----	1
A	EP-A-0 516 135 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) * le document en entier * ----	5
A	EP-A-0 402 088 (MERCK & CO. INC.) * le document en entier * ----	5
A	SCIENCE, vol. 252, 17 Mai 1991 LANCASTER, PA US, pages 961-965, WAIN-HOBSON, S. ET AL. 'LAV revisited: origins of the early viral HIV-1 isolates from Institut Pasteur' * le document en entier * -----	5
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
		C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
2 Octobre 1995		Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		